대한척추외과학회지 제12 권 제 3 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 12, No. 3, pp 164~173, 2005

아텔로콜라겐 지지체와 성장인자에 의한 조직 공학적 추간판의 재생

이광일[§] · 문성환 · 김정환[#,§] · 박시내[#,§] · 서 활[#,§]
최윤진 · 박시영 · 김학선 · 이환모

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 의용공학교실[#], 연세대학교 BK21 의과학사업단[§]

Tissue Engineered Intervertebral Disc by Atelocollagen Scaffolds and Growth Factors

Kwang-Il Lee, BSc[§], Seong-Hwan Moon, M.D., Jeong-Hwan Kim, BSc[#,§], Si-Nae Park, Ph.D.[#,§], Hwal Suh, DDS[#,§], Yun-Jin Choi, M.D., Si-Young Park, M.D., Hak-Sun Kim, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Department of Medical Engineering[#], Brain Korea 21 Project Team for Medical Science[§], Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Study Design: In vitro experimental study.

Objectives: To examine the cellular proliferation, synthetic activity and phenotypical expression of intervertebral disc (IVD) cells seeded on types I and II atelocollagen scaffolds, with the stimulation of TGF-β and BMP-2.

Summary of Literature Review: Recently, tissue engineering is regarded as a new experimental technique for the biological treatment of degenerative IVD diseases, and has been highlighted as a promising technique for the regeneration of tissues and organs in the human body. Research on cell transplantation in artificial scaffolds has provided that the conditions for tissue engineering have to be equilibrated, including the cell viability and proliferation, maintenance of characteristic phenotype, suitable scaffolds in organisms and biologically stimulated growth factor.

Material and Method: Lumbar IVD cells were harvested from 10 New Zealand white rabbits, with the nucleus pulposus cells isolated by sequential enzymatic digestion. Each of 1% types I and II atelocollagen dispersions were poured into a 96-well plate (diameter 5 mm), frozen at -70℃, and then lyophilized at -50℃. Fabricated porous collagen matrices were made using the cross-linking method. Cell suspensions were imbibed by surface tension into a scaffold consisting of atelocollagen. The cell cultured scaffolds were then treated with TGF-β (10 ng/ml) or BMP-2 (100 ng/ml) or both. After 1 and 2 week culture periods, the DNA synthesis was measured by [^{3}H] thymidine incorporation, and newly synthesized proteoglycan by incorporation of [^{35}S] sulphate. Reverse transcription-polymerase chain reactions for the mRNA expressions of type I and II collagen, aggrecan and osteocalcin were performed. The inner morphology of the scaffolds was determined by scanning electron microscopy (SEM).

Address reprint requests to
Hwan-Mo Lee, M.D.
Department of Orthopaedics Surgery Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea
Tel: 82-2-2228-2191, Fax: 82-2-363-1139, E-mail: hwanlee@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 부분적으로 연세대학교 일반교수연구비 (6-2004-1084), 한국 존슨앤존슨 메디컬, Brain Korea 21에 의해 지원되었음.

Results: The IVD cultures in collagen type II with TGF-β demonstrated an increase in proteoglycan synthesis and up regulation of aggrecan and types I and II collagen mRNA expressions compared to the control. IVD cultures in the type I atelocollagen scaffold with growth factors exhibited an increase in DNA synthesis and up regulation of the type II atelocollagen mRNA expression. With all combinations of growth factor, the IVD cultures in types I and II atelocollagen scaffolds showed no up regulation of the osteocalcin mRNA expression. Furthermore, there was no synergistic effect of TGF-β and BMP-2 in the matrix synthesis or for the mRNA expression of the matrix components.

Conclusions: Nucleus pulposus cells from rabbit were viable in atelocollagen types I and II atelocollagen scaffolds. The type I atelocollagen scaffold was suitable for cell proliferation, but the type II atelocollagen scaffold was more suitable for extracellular matrix synthesis. The IVD cells in both scaffolds were biologically responsive to growth factors. Taken together, nucleus pulposus cells in atelocollagen scaffolds, with anabolic growth factors, provide a mechanism for tissue engineering of IVD cells.

Key Words: Intervertebral disc, Atelocollagen, TGF-β, BMP-2, Tissue engineering

서 론

추간판의 퇴행은 추간판 내의 당단백과 제 2형 교원질의 감소에 의한 수핵 내의 수분 분압 감소에 기인한다[1-7]. 추간판의 퇴행은 추간판 내장증, 추간판 탈출증, 척수증, 요천추 신경근 병변, 척추관 협착증 등과 같은 다양한 척추 질환을 일으켜 환자에게 심각한 고통을 끼치며 이와 관련된 의료비용도 나날이 증가하고 있다. 그럼에도 불구하고 새로운 대안 없이, 퇴행성 척추 질환 환자들에 대한 고식적인 치료법인 추간판 제거술, 척추간 골유합술 등이 주로 시행되고 있는 실정이다.

최근, 조직공학은 퇴행성 추간판 질환의 생물학적 치료를 위한 미래의 새로운 연구 기술로 언급되고 있으며 이는 신체의 조직과 기관의 재생을 가능케 하는 전도유망한 기술로 각광받고 있다[8,9]. 인공 제작된 지지체에 세포를 이식하는 실험을 통해, 조직공학은 세포의 생존 및 증식, 재생되려는 조직의 고유한 표현형 유지, 생체에 해롭지 않은 적합한 지지체, 그리고 성장인자와 같은 생물학적인 자극 등의 조건들이 조화를 이뤄야한다고 알려져 있다[10-13].

또한 성장인자를 처리한 연골세포 및 추간판 세포의 재생 실험을 통해서 TGF-β (Transforming growth factor-β)과 BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2)가 당단백 증가, 교원질 생성, 그리고 세포 증식에 있어 효과적 이었다[14-17]. 그리고 조직의 재생을 위한 지지체로서의 재료 및 구조에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데, 섬유질 단백질 성분인 아텔로콜라겐 지지체에 섬유륜 세포를 이식해서 단층세포배양과 비교한 실험에서는 아텔로콜라겐 지지체 내에서 세포의 당단백 생성이 우수하다는 연구결과가 발표되었다[18-21].

따라서 본 연구에서는 불용성 교원질에서 텔로펩타이드만을 분해하여 가용화한 제 1형, 2형 아텔로콜라겐으로 제작된 각각의 지지체에 시험관내에서 분리 배양한 추간판 세포를 이식하고, TGF-β과 BMP-2 등의 성장인자를 조건별로 자극시키면서 배양하였을 때 세포의 증식과 당단백 생성량, 연골성 세포 표현형 발현 유지 등에 적합한 지를 알아보았다.

연구대상 및 방법

1. 세포 배양

10마리의 뉴질랜드 흰 토끼(3.5 kg, 암컷)에게서 추간판 조직을 채취하고, 섬유륜에 둘러싸인 수핵부를 분리하였다. 채취된 추간판의 수핵 세포는 순차적 효소 소화법에 의해 조직으로부터 분리되었다. 먼저 세척된 추간판 수핵 부위를 잘게 썰고, Hams F-12 배지와 1% (v/v) penicillin, streptomycin, nystatin (all antibiotics from Gibco-BRL, Grand Island, NY)에 0.4% (w/v) protease, 0.004% (w/v) DNase (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37℃에서 60분간 소화시켰다. Hams F-12 배지로 세척 후 0.025% (w/v) collagenase type II, 0.004% (w/v) DNase (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37℃에서 3시간동안 소화시켰다. 분리된 추간판 수핵 세포는 Hams F-12 배지로 2회 세척 후, Nylon 여과지 (Falcon, Franklin Lakes, NJ, pore size 100 μm)를 사용하여 부유 조직을 제거하였다. 수핵 세포는 10% 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Gibco-BRL, Grand Island, NY), 1% (v/v) antibiotic-antimycotic, 25 μg/ml ascorbic acid가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium and Hams F-12 medium (DMEM/F-12, Gibco-BRL, Grand Island, NY)을 사용

하여 T-25 flask (NUNC, Rockilde, Denmark)에서 37℃, 5% CO_2하에서 배양하였다. 3일 간격으로 배지를 갈아 주었으며 세포는 3주일간 배양되었다.

2. 아텔로콜라겐 지지체의 제작

각각 1%의 제 1형, 2형 아텔로콜라겐 (Regenmed, Seoul, Korea) 56 μl를 96-well plate (Falcon, Franklin Lakes, NJ)에 붓고 -70℃에서 동결시킨 후, -50℃에서 냉동 건조시켰다. 제작된 다공성의 교원질 물질들은 50 mM의 1-ethyl-(3-3-dimethylaminoprpyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에서 24시간 동안 교차 결합되었다. 이렇게 얻어진 지지체는 초음파 분쇄기를 사용하여 증류수로 세척한 후, -50℃에서 다시 냉동 건조 처리를 하였다[22,23].

3. 아텔로콜라겐 지지체로의 세포 이식

배양된 토끼의 추간판 수핵 세포를 Trypsin/EDTA (Calbiochem, La Jolla, CA) 처리를 하여 Culture flask로부터 떼어내고, 96-well plate (Falcon, Franklin Lakes, NJ)에 아텔로콜라겐 지지체를 깔아 놓았다. 지지체는 전 날 에탄올 소독 처리를 마친 상태이며, DMEM/F-12 배지에 보관되어 있었다. 마이크로 파이펫을 사용하여 지지체에 있는 수분을 최대한 제거한 후, 세포 생존성 검사 및 세포밀도를 계산해서 5×10^5세포/ml의 밀도로 표면 장력의 효과를 이용하여 지지체의 중심부에 이식했다. 세포 배양액은 10% FBS, 25 μg/ml ascorbic acid, 1% antibiotics가 혼합된 DMEM/F-12을 사용하고 37℃, 5%의 CO_2하에서 4시간 동안 배양한 후, 5% FBS가 처리된 배지에 10 ng/ml의 TGF-β1, 100 ng/ml의 BMP-2 그리고 두 성장인자를 1:1의 비율로 혼합 처리된 용액 100 μl를 첨가하였다. 성장 인자가 혼합된 배지는 2일 간격으로 교체되었고 총 2주일간 배양하였다.

4. TGF-β1 및 BMP-2 준비

TGF-β1은 R&D(R&D Systems, Inc. USA)로부터 구입하였고, BMP-2는 다음과 같이 제조하였다[24]. 진핵 세포 유전자 발현 plasmid DNA인 pcDNA3.1/hygro vector를 이용하여 인간 BMP-2의 유전자를 재조합 한 후, Chinese hamster ovary (CHO-K1)세포에 lipofectamine (Gibco BRL)을 이용하여 재조합 유전자 pcDNA3.1/hygro/BMP-2를 전이시켰다. 전이된 CHO-K1세포를 hygromycin이 들어 있는 배지로 두 달 간 배양하여 완전 전이 세포 (CHO-K1/BMP-2)를 얻는다. 분리한 세포에서 배지로 분비되어 나오는 인간 재조합 BMP-2를 수집, Heparin sepharose A chromatography를 통해 동정한 후, YM10막을 통한 고농축 법으로 농축하여 세포 배양에 사용할 수 있도록 멸균하고 사용 용량에 맞게 나누어서 -70℃에 보관하였다.

5. 세포 증식 반응 측정

토끼의 추간판 수핵 세포가 이식된 아텔로콜라겐 지지체에 [methyl-^{3}H] thymidine 5 μCi/ml (Amersham Phamacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 첨가된 배지를 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포가 이식된 지지체를 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco-BRL, Grand island, NY)로 조심스럽게 씻어내고 scintillation vial에 담아 liquid scintillation cocktail 용액 3 ml을 첨가하여 섞은 후, 24시간 동안 상온에서 건조시켰고 beta scintillation counter(Packard, Downers Grove, IL)를 이용하여 DNA의 양을 측정하였다.

6. 당단백 생성 측정

지지체에 이식된 세포들을 [^{35}S] sulfate 20 μCi/ml (Amersham Phamacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 첨가된 배양액에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 상층액은 분리하여 -70℃에 보관하고, 세포에는 4M guanidine hydrochloride, 50 mM sodium acetate (pH5.8) 그리고 0.1M 6-aminohexanoic acid, 10 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt), 5 mM Benzamidine hydrochloride, 10 mM N-ehylmaleimide, 0.5 mM pheynylmethyl-sulfonyl fluoride가 혼합된 proteinase inhibitor를 첨가하여 4℃에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다. 방사선 동위원소 [^{35}S]로 표식된 당단백의 정략적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 세포와 -70℃에 얼려두었던 상층액을 함께 통과시켜 scintillation vial에 순차적으로 용출시켰다. 2, 3, 4번째 용출된 용액에 6 ml의 liquid scintillation cocktail (Beckman, Fullerton, CA) 용액을 첨가하여 섞은 후, 24시간 동안 상온에서 방치하였고, Beta scintillation counter를 통해 당단백 생성량을 측정하였다.

7. Aggrecan, 제 1형, 2형 교원질, osteocalcin의 mRNA 발현 검사

RNeasy mini kit (QIAGEN, Maryland, USA)를 이용하여 Total RNA를 분리하였다. 토끼의 추간판 수핵 세포의

Total RNA 1㎍와 oligo (dT) 1 ㎕ (Invitrogen, USA, 0.5 ㎍/㎕)와 3차 증류수를 혼합하여 50 ㎕으로 혼합한 후, AccuPower RT-premix (Bioneer, 대전, 한국)에 넣어 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 하였다. 42℃에서 60분, 94℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였고, 합성한 cDNA를 에탄올로 정제하여, 최종 부피 20 ㎕를 만들었다. 이중 각각의 cDNA 1 ㎕를 취하여, sense primer와 antisense primer 10pmole, 3차 증류수를 혼합하여 10 ㎕의 반응용액을 만들어 Sapphire PCR-premix (Sapphire, USA)에 넣고, RT(Real Time)-PCR을 시행하였다(Table 1,2). PCR 생성물은 2% agarose젤에서 전기영동을 통해 각 유전자의 발현을 검출하였다. RT-PCR에 대한 대조군으로 beta actin을 사용하였으며 TINA 2.0e program을 통해 각각의 발현 정도를 비교 분석하였다.

8. 아텔로콜라겐에 이식된 추간판 세포의 형태 관찰

세포 배양한 지 각각 7일 째와 14일 째 되는 날, 주사전자 현미경을 통하여 다공성의 아텔로콜라겐 지지체 내에 이식된 토끼의 추간판 수핵 세포를 관찰함으로서, 각 지지체의 내부 구조, 지지체 내에서의 추간판 세포 생존성 및 기질 생성의 여부를 분석하였다.

9. 실험군

아텔로콜라겐 지지체에 5×105개수의 토끼 추간판 수핵 세포를 이식한 후, TGF-β1 (10 ng/ml), BMP-2 (100 ng/ml) 그리고 이 두 성장인자를 1:1로 혼합한 용액을 각각 처리하여 총 2주일간 배양하였다. 이 때 성장인자가 혼합된 배양액은 2일 간격으로 교체하였다. 각 배양군에서 세포 증식 반응, 당단백 생성 및 aggrecan, 제 1형, 2형 교원질, osteocalcin에 대한 mRNA 발현을 측정하였으며, 성장인자를 넣지 않고 DMEM/F-12(5% FBS, 1% v/v antibiotics, 25 ㎍/ml ascorbic acid)만 처리한 추간판 세포가 이식된 아텔로콜라겐을 대조군으로 정하였다.

10. 통계

위와 같은 실험을 3회에 걸쳐서 반복하여 결과를 얻었으며, 모든 자료는 대조군(지지체에 성장인자 없이 세포가 이식된 군)에 대한 백분율로서 평균±표준편차로 표시하였으며, SPSS (SPSS Inc. Chicago IL)를 이용하여 처리하였다. One-way Analysis of variance 및 Fisher's protected LSD post-hoc test, power analysis로 실험군간 비교하였다. 통계 방법의 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다.

Table 1. Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA

Gene	Sequence (5'→3')	Length	Size (bp)
Aggrecan	AGG TGT TGT GTT CCA CTA TC	20	378 bp
	GTC ATA GGT CTC GTT GGT GT	20	
Collagen type I	AGA AGG AGT AAC CTC CAA GG	20	321 bp
	ATG ACC AAA GGT GCA ATA TC	20	
Collagen type II	GCA CCC ATG GAC ATT GGA GG	20	367 bp
	GAC ACG GAG TAG CAC CAT CG	20	
Osteocalcin	AAG AGA TCA TGA GGA GCC TG	20	420 bp
	AGG AAA CAA GCA CTG TGC AT	20	
Beta-actin	GCC ATC CTG CGT CTG GAC CT	20	228 bp
	GTG ATG ACC TGG CCG TCG GG	20	

Table 2. PCR conditions

Primer	Conditions			
	Denaturation	Annealing	Polymerization	Cycles
Aggrecan	94℃ 30sec	50℃ 30sec	72℃ 90sec	30
Collagen type I	94℃ 5sec	50℃ 5sec	72℃ 30sec	26
Collagen type II	94℃ 5sec	50℃ 5sec	72℃ 30sec	30
Osteocalcin	94℃ 5sec	46℃ 5sec	72℃ 30sec	25
Beta-actin	94℃ 5sec	58℃ 5sec	72℃ 30sec	30

결 과

1. 세포 증식에 따른 신생 당단백의 생성

DNA synthesis를 통한 세포의 증식을 알아본 결과, TGF-β을 투여한 추간판 세포가 이식된 제 1형 아텔로콜라겐 지지체 실험군의 경우, 2주째 세포 증식에서 대조군과 비교했을 때 238%의 증가율을 보였고, 2주째 배양한 세포들은 1주째 배양한 실험군에 비해 276%가 증가하였다. 또한 TGF-β과 BMP-2를 혼합한 용액을 첨가한 실험군에서도 세포의 증식은 유의하게 증가하였다(Fig. 1A). 그리고 신생 당단백의 생성을 측정한 결과, 제 1형 아텔로콜라겐 지지체에 이식된 추간판 수핵 세포의 경우는 배양 기간 및 성장인자의 종류에 관계없이 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 1B).

한편 제 2형 아텔로콜라겐 지지체의 실험군에서는 TGF-β과 BMP-2를 각각 처리한 군에서는 세포 증식이 증가하였으나 이는 1주 배양군에서만 의미가 있었고, 2주 배양군에서는 대조군에 비해 유의한 변화가 없었다. TGF-β과 BMP-2 혼합 처리한 군에서는 배양 1, 2주 모두에서 대조군에 비해 세포증식의 증가는 없었지만 2주 배양군은 1주 배양군에 비해 증가하였다(Fig. 2A). 또한 신생 당단백의 생성을 측정한 결과, TGF-β과 BMP-2를 혼합한 용액을 첨가한 제 2형 아텔로콜라겐 지지체의 실험군의 경우, 배양 2주째 대조군과 비교했을 때 535%의 당단백 증가율을 보였고, TGF-β만 첨가된 실험군에서도 배양 2주째 대조군에 비해 524%의 증가율을 보였다. 그렇지만 BMP-2만 첨가된 실험군에서는 대조군에 비해 유의한 당단백 생성을 보이지 않았다(Fig. 2B).

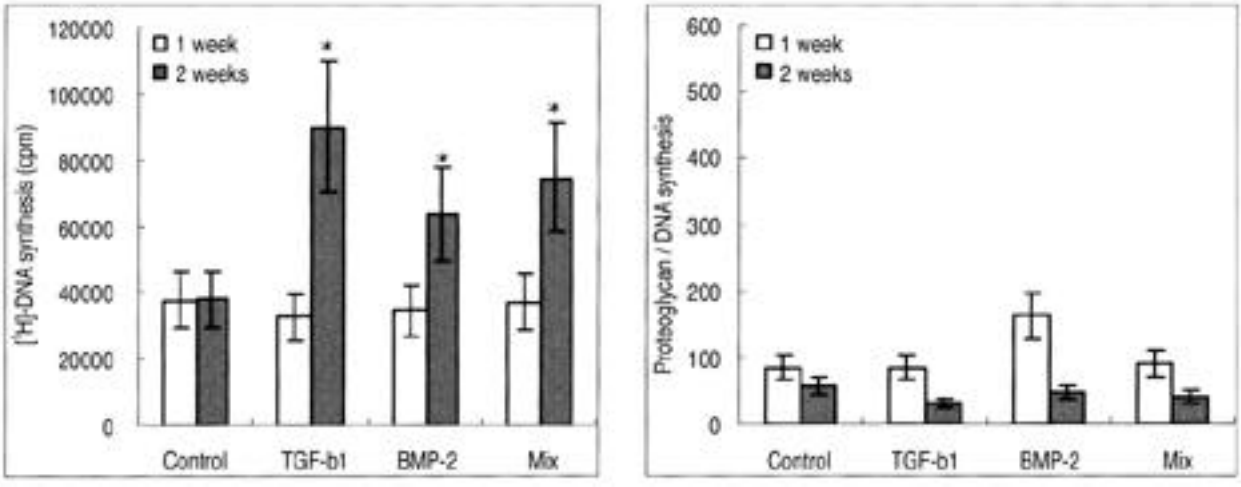

Fig. 1. Rabbit nucleus pulposus cells seeded on atelocollagen type I scaffold. (**A**) DNA synthesis, (**B**) Proteoglycan synthesis (*p>0.05)

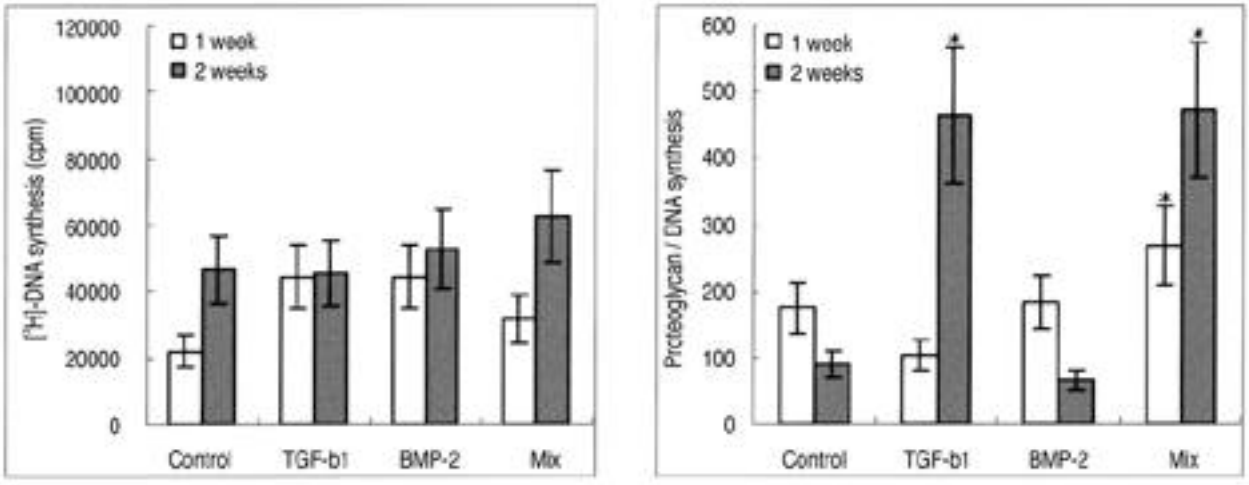

Fig. 2. Rabbit nucleus pulposus cells seeded on atelocollagen type II scaffold. (**A**) DNA synthesis, (**B**) Proteoglycan synthesis (*p>0.05)

2. Aggrecan, 제 Ⅰ형, Ⅱ형 교원질, osteocalcin의 mRNA 발현

RT-PCR에 대한 전기영동 결과, 모든 실험군에서 BMP-2에 의한 추간판 연골 세포의 골형성 인자(osteocalcin)는 생성되지 않았다(Fig. 3A-B). 각각의 mRNA 발현을 densitometry를 통해 분석한 결과, 제 1형 아텔로콜라겐 지지체에 TGF-β과 BMP-2가 혼합 처리된 실험군의 경우는 제 2형 교원질의 mRNA 발현이 대조군에 비해 513%가 증가하였고, 1주째보다 2주째의 실험군이 196%가 증가하였다. 또한 TGF-β만 처리한 제 1형 아텔로콜라겐 지지체 실험군에서는 제 1형, 2형 교원질의 mRNA 발현이 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 4A-C). 반면에 TGF-β과 BMP-2을 혼합한 용액을 첨가한 제2형 아텔로콜라겐 지지체 실험군의 경우, 대조군과 비교했을 때 제 1형, 2형 교원질의 mRNA 발현이 증가하였고 1주째의 실험군보다 2주째가 더 증가하였다. TGF-β만 첨가된 실험군에서는 aggrecan, 제 1형, 2형 교원질의 mRNA 모두가 대조군에 비해 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그렇지만 BMP-2만 첨가된 실험군에서는 대조군에 비해 제 1형 교원질의 mRNA 발현만이 증가하였다(Fig. 5A-C).

3. 주사 전자 현미경 관찰

아텔로콜라겐 지지체를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 각각의 지지체의 다공성 구조를 확인할 수 있었는데 제 2형 지지체가 제 1형에 비해 더욱 치밀한 다공성 구조를 형성하고 있었다. 아텔로콜라겐 지지체 내에서 각각 7일, 14일간 추간판 세포를 배양한 결과, 이식된 대부분의 추간판 세포들은 다공성의 지지체에 부착되었으나, 제 2형 지지체에 붙은 세포가 제 1형에 비해 좀 더 안정적으로 붙어 있는 것을 확인할 수 있었다. 한편 추간판 세포 표면에 세포외 기질이 생성된 것을 현미경 상으로 관찰할 수 있었는데, 역시 제 2형 지지체가 제 1형에 비해 기질의 생성량이 풍부한 것을 관찰하였다(Fig. 6).

고 찰

아텔로콜라겐은 피부 세포조직을 구성하는 세포로 구성된 일종의 섬유질 단백질 (fibrous protein)로 알려져 있는데 이 물질이 체내로 주입되면 항체 (antibody)를 형성시킬 수 있는 항원 (antigen)으로 작용할 수도 있다. 하지만 일단 항체 형성을 유발하는 구성 물질(antigenic component)을 제거하고 나면 이로 인해 발생할 수 있는 자가면역 반응(automatic immune response)을 방지할 수 있기 때문에 세포 이식을 하였을 경우, 생존이 가능할 수 있고 체내에 주입 시 부작용이 일어날 가능성이 적다고 알려져 있다[25,26]. 또한 유전자 치료법에 사용되는 DNA가 체내에서 서서히 방출되도록 하는 유전자 전달 방법(gene transfer method)이 아텔로콜라겐을 통해 개발되었다는 보고가 있어서 향후 본 연구에서 유전자 치료의 적

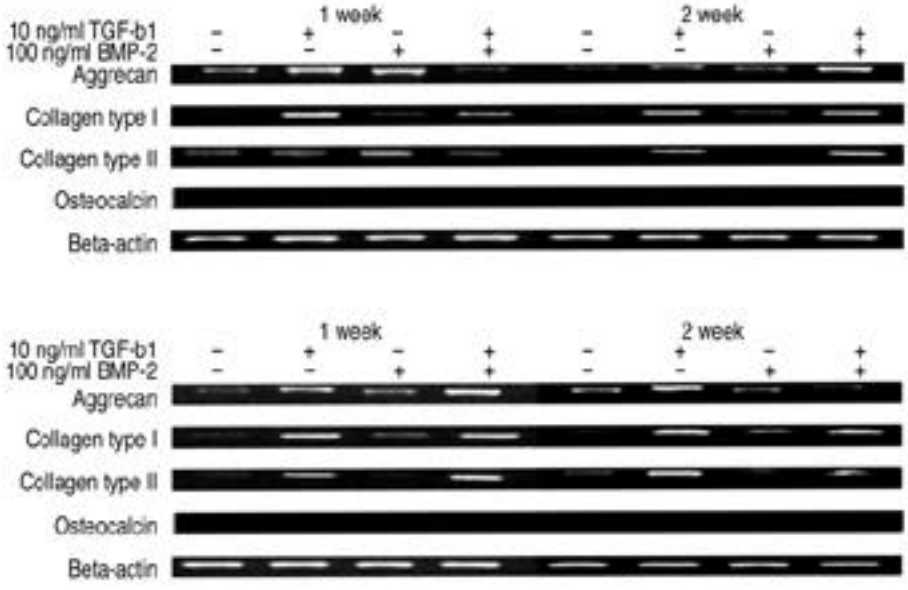

Fig. 3. RT-PCR of beta-actin, aggrecan, collagen type I and type II, osteocalcin. (**A**) Atelocollagen type I scaffold. (**B**) Atelocollagen type II scaffold.

용에 있어서도 적합한 재료라고 볼 수 있다[27].

한편 TGF-β1과 BMP-2는 척추 추간판의 연골성 표현형을 촉진시킨다는 보고가 있었으며, 단일의 성장인자를 사용하였을 때보다 두 가지 이상의 성장인자가 혼합된 칵테일 용액을 사용하였을 때 추간판 세포의 당단백 생성량이 유의하게 높았으며, 특히 TGF-β1과 BMP-2의 칵테일 용액이 다른 성장인자들의 조합보다 우수하다는 보고가 있었다[28].

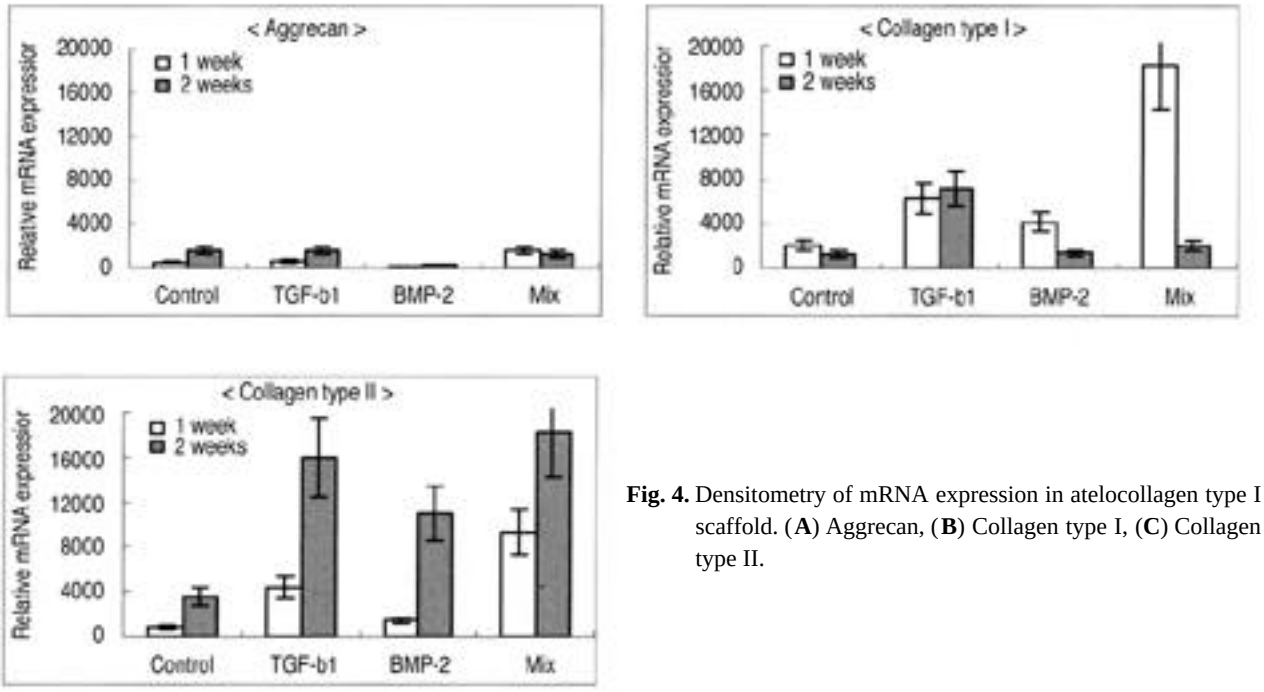

Fig. 4. Densitometry of mRNA expression in atelocollagen type I scaffold. (**A**) Aggrecan, (**B**) Collagen type I, (**C**) Collagen type II.

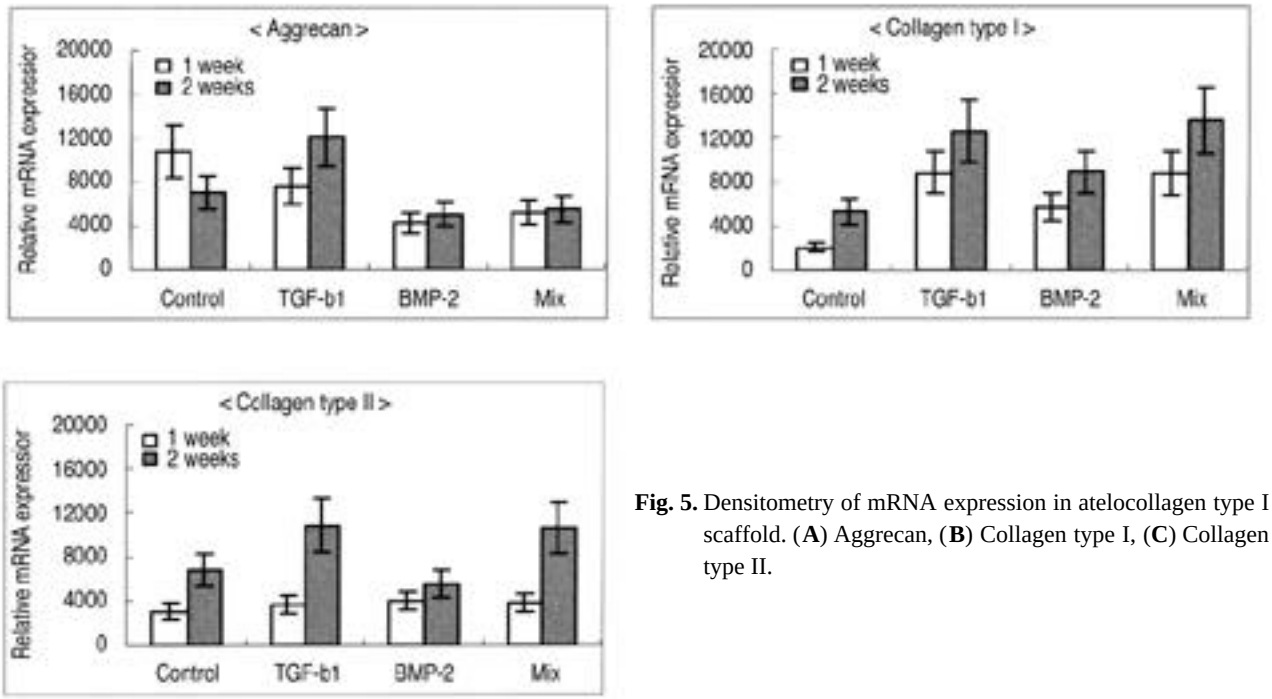

Fig. 5. Densitometry of mRNA expression in atelocollagen type I scaffold. (**A**) Aggrecan, (**B**) Collagen type I, (**C**) Collagen type II.

본 연구에서는 아텔로콜라겐으로 만들어진 지지체에 토끼의 추간판 수핵 세포를 이식하고 성장인자를 첨가시킨 후 세포 증식, 기질 생성, 기질 성분 mRNA의 발현 등을 조사하였는데, 세포 증식에 따른 기질 생성 결과를 보면, 제 2형 아텔로콜라겐 지지체에 이식된 실험군의 경우 대조군 및 제 1형 아텔로콜라겐 실험군에 비해 유의하게 증가하였다. 특히 TGF-β1을 첨가한 경우와 TGF-β1과 BMP-2의 칵테일 용액이 첨가된 실험군이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한 기질 성분인 aggrecan, 제 1형, 2형 교원질의 mRNA 발현이 모두 증가함으로서 연골성 표현이 우수함을 확인할 수 있었다. 반면 제 1형 아텔로콜라겐 지지체에 이식된 실험군의 경우 세포외 기질 생성보다는 세포 증식이 활발히 일어났으며, 연골성 표현형인 제 2형 교원질의 mRNA 발현은 대조군과 제2형 아텔로콜라겐 실험군에 비해 유의하게 증가하였다. 이러한 결과들은 TGF-β1, BMP-2의 성장 인자가 추간판 세포의 기질 재생에 있어 효과적임을 제시하는 것이며, 제 1형 아텔로콜라겐은 추간판 세포의 증식에 있어서 효과적인 지지체이며, 제 2형 아텔로콜라겐은 추간판 세포의 기질 생성에 적합한 지지체라고 사료된다. 한편 전자 주사 현미경을 통해 2주일간 배양된 추간판 세포의 형태를 관찰한 결과, 세포가 모든 지지체에 안정적으로 부착되어 있었으며, 기질이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 아텔로콜라겐 지지체에서 추간판 세포가 어떤 독성의 영향 없이 생존 가능하다는 것을 의미한다. 따라서 조직 공학적 기법을 통해 아텔로콜라겐 지지체에서 배양된 척추 추간판 세포는 세포 증식 및 기질 생성에 있어 효과적이라고 할 수 있다.

본 연구에 있어서 제한점은 실험관 내 실험만 한 것이기 때문에, 향후 생체 내 실험을 통한 안정성 및 효과를 검정해야 할 것이다. 또한 바이러스를 이용한 유전자 전달을 적용시켜 유전자 치료의 가능성도 확인해야 할 것이다[29,30].

결 론

본 연구에서 척추 추간판 세포는 아텔로콜라겐 지지체 내에서 생존 가능하였다. 제 1형 아텔로콜라겐 지지체에서는 세포의 증식이 활발하였고, 제 2형 아텔로콜라겐 지지체에서는 기질 생성이 활발하였다. TGF-β1 단독 및 BMP-2와 혼합 처리한 성장 인자를 투여했을 경우 추간판 연골 세포의 표현형이 유지되었으며, 당단백 생성 및 연골성 기질성분의 생성이 증가하였다. 한편 BMP-2에 의한 추간판 연골 세포의 골성 인자 (osteocalcin)는 생성되지 않았다.

따라서 본 연구는 세포외 기질 생성이 활발한 제 2형 아텔로콜라겐이 세포 증식이 활발한 제 1형 아텔로콜라겐으로 둘러쌓인 지지체가 성장인자와 조화를 이룬다면, 추간판 세포는 연골 세포의 표현형을 유지시키면서 세포 증식 및 기질 생성을 활발히 유발시킬 수 있는 인공디스크의 제작이 가능하다는 데에 의의를 둔다. 향후 아텔로콜라겐과 성장인자의 조합은 추간판 퇴행성 기질 감소의 임상적 치료에도 안전하고 용이하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

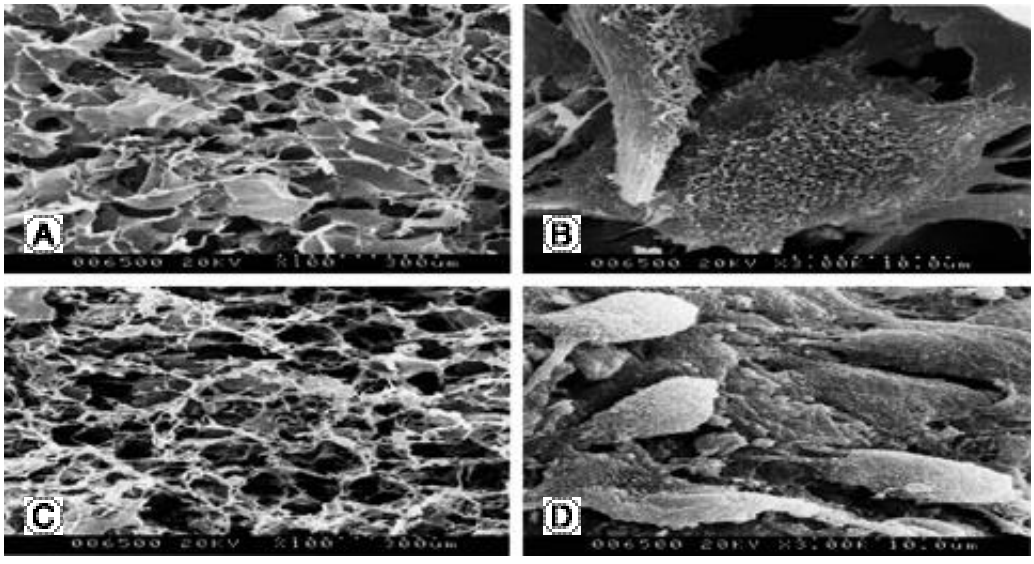

Fig. 6. Morphology of porous atelocollagen scaffolds on scanning electron microscopy (SEM). (A, B) Atelocollagen type I scaffold (×100, ×3,000), (C, D) Atelocollagen type II scaffold (×100, ×3,000).

참고문헌

1) **Adams P, Muir H**: *Qualitative changes with age of pro - teoglycans of human lumbar discs. Ann rheum Dis, 1976;35:289-296.*
2) **Benoist M**: *Natural history of the aging spine. Eur Spine J, 2003;12:S86-S89.*
3) **Friberg S, Hirsch C**: *Anatomical and clinical studies on lumbar disc degeneration. Acta Orthop Scand, 1949;19: 222-242.*
4) **Guiot BH, Fessler RG**: *Molecular biology of degenerative disc disease. Neurosurgery, 2000;47:1034-1040.*
5) **Lipson SJ, Muir H**: *Experimental intervertebral disc degeneration. Arthritis Rheum, 1981;24:12-21.*
6) **Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB**: *Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. Biochim Biophys Acta, 1981;673:443-453.*
7) **Prescher A**: *Anatomy and pathology of the aging spine. Eur J Radiol, 1998;27:181-195.*
8) **Gruber HE, Hanley EN**: *Recent advances in disc cell biology. Spine, 2003;28:186-193.*
9) **Mochida J**: *New strategies for disc repair: novel preclini - cal trials. J Orthop Sci, 2005;10:112-118.*
10) **Alini M, Li W, Markovic P, Aebi M, Spiro RC, Rough- ley PJ**: *The potential and limitations of a cell-seeded col - lagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. Spine, 2003;28:446-454.*
11) **An HS, Thonar EJ, Masuda K**: *Biological repair of intervertebral disc. Spine, 2003;28:S86-S92.*
12) **Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ**: *Transplan - tation of cells in matrices for tissue regeneration. Adv Drug Deliv Rev, 1998;33:165-182.*
13) **Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG**: *Effect of pore size and void fraction on cel - lular adhesion, proliferation, and matrix deposition. Tis - sue Eng, 2001;7:557-572.*
14) **Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J et al.**: *Bone morpho - genetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in algi - nate beads. Osteoarthritis Cartilage, 2004;12: 559-567.*
15) **Kim SE, Park JH, Cho YW et al.**: *Porous chitosan scaf - fold containing microspheres loaded with transforming growth factor-β: implications for cartilage tissue engi - neering. J Control Release, 2003;91:365-374.*
16) **Moon SH, Kim DJ, Kim H et al.**: *Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. Spine, 2003;28:2679-2684.*
17) **Qi WN, Scully SP**: *Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-β. J Orthod Res, 1997;15:483-490.*
18) **Itoh H, Aso Y, Furuse M et al.**: *A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold. Artificial Organs, 2001;25:213-217.*
19) **Sato M, Asazuma T Ishihara M et al.**: *An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. J biomed Mater Res, 2003;64A:248-256.*
20) **Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, Yamada H, Maeda H, Fujikawa K**: *Glycosaminoglycan accumulation in prima - ry culture of rabbit intervertebral disc cells. Spine, 2001;26:2653-2660.*
21) **Sato M, Asazuma T, Ishihara M et al.**: *An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. Spine, 2003;28:548-553.*
22) **Park SN, Lee HJ, Lee KH, Suh H**: *Biological character - ization of EDC-crosslinked collagen hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. Biomaterials, 2003;24:1631-1641.*
23) **Park SN, Kim JK, Suh H**: *Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substi - tute. Biomaterials, 2004;25:3689-3698.*
24) **Wang EA, Rosen V, D'alessandro JS et al.**: *Recombi - nant human bone morphogenetic protein induces bone for - mation. Proc Natl Acad Sci, 1990;87:2220-2224.*
25) **Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y et al.**: *Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. Biomaterials, 2003;24:3531-3541.*
26) **Vizarova K, Bakos D, Rehakova M et al.**: *Modification of layered atelocollagen: enzymatic degradation and cytotoxicity evaluation. Biomaterials, 1995;16:1217-1221.*
27) **Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M**: *Bio - materials for gene delivery: atelocollagen-mediated con - trolled release of molecular medicines. Curr Gene Ther, 2001;1(1):31-52.*
28) **Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD**: *Gene therapy for degenerative disc disease. Gene Ther, 2004;11:390-401.*
29) **Moon SH, Gibertson LG, Nishida K et al.**: *Human inter -*

vertebral disc cells are genetically modifiable by aden - ovirus-mediated gene transfer. Spine, 2000;25:2573-2579.

30) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG et al.**: *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β1 encoding gene. Spine, 1999;24:2419-2425.*

국 문 초 록

연구계획: 제 1형, 2형 아텔로콜라겐 지지체에 추간판 수핵 세포를 이식한 후 성장인자(TGF-β1, BMP-2)를 조건별로 투여한 후, 1주와 2주에 걸쳐 배양한다.

연구목적: 아텔로콜라겐 지지체에 조건별로 이식된 추간판 세포의 세포 분열, 표현형 발현, 기질 생성 효과를 알아보았다.

대상 및 방법: 뉴질랜드 흰 토끼 10마리로부터 추간판 조직 내의 수핵 부위를 분리하고 순차적 효소처리에 의해 수핵 세포를 배양한다. 각각 1%의 제 1형, 2형 아텔로콜라겐을 96-well plate에 넣고, -70℃에서 냉동시킨 후 다시 -50℃에서 냉동건조 처리를 한다. 이렇게 제작된 다공성의 교원질 물질은 교차 결합 방식에 의해 지지체로 완성된다. 표면장력을 이용하여 추간판 세포들이 아텔로콜라겐 지지체로 이식되고, 세포가 이식된 지지체에는 10 ng/ml의 TGF-β1 혹은 100 ng/ml의 BMP-2, 그리고 두 성장인자들이 혼합된 용액을 첨가한다. 배양한 지 각각 1주와 2주 후, [methyl-^{3}H] thymidine incorporation을 통해 DNA의 양을 측정하고, [^{35}S] sulfate incorporation을 통해서 기질 생성량을 측정한다. 또한 RT-PCR을 통해 기질성분인 aggrecan, 제 1형, 2형 교원질 그리고 골성인자인 osteocalcin의 mRNA 발현 정도를 알아보고, 주사 전자 현미경 관찰을 통해 아텔로콜라겐 지지체의 내부 형태를 관찰한다.

결과: TGF-β1이 투여된 제2형 아텔로콜라겐 배양군은 세포의 기질 생성이 증가하였고, 기질 성분인 aggrecan, 제 1형, 2형 교원질의 mRNA 발현도 대조군에 비해 증가하였다. 한편, 제1형 아텔로콜라겐 배양군은 세포의 증식이 매우 활발하였으며 제2형 교원질의 mRNA 발현이 대조군보다 유의하게 증가하였다. 그렇지만 어떤 지지체의 배양군에서도 추간판 연골 세포의 골성인자인 osteocalcin의 mRNA 발현은 나타나지 않았다. 또한 기질 생성과 기질 성분의 mRNA 발현에 있어서 TGF-β1과 BMP-2간의 상호 상승작용은 나타나지 않았다.

결론: 제 1형, 2형 아텔로콜라겐에 이식 배양된 토끼의 추간판 수핵 세포는 생존 가능하였고, 제1형 아텔로콜라겐 지지체는 추간판 세포의 증식이 활발하였으며, 제 2형 아텔로콜라겐 지지체는 세포외 기질 생성이 제1형 아텔로콜라겐 지지체에 비해 우수하였다. 또한 두 지지체의 배양군들은 TGF-β1 및 BMP-2 성장인자에 생물학적으로 반응하였다. 따라서 성장인자가 처리된 아텔로콜라겐 지지체에서 자란 추간판세포는 조직공학적추간판의 재생에 적합하였다.

색인단어: 척추 추간판 세포, 아텔로콜라겐, TGF-β, BMP-2, 조직공학

※ **통신저자 :** 이 환 모
서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세의료원 정형외과학교실
Tel: 82-2-2228-2191 Fax: 82-2-363-1139 E-mail: hwanlee@yumc.yonsei.ac.kr